

.A vizsgálatok során immunprecipitációval, anti p85 antitesttel (p85 = a PI 3-kináz regulációs alegysége) illetve anti IRS (insulin receptor substrate 1) antitesttel PI 3-kináz aktivitásra utaló jeleket (foszfatidil inositol foszforiláció) kaptunk, ami jelzi ennek az enzimnek a *Tetrahymenában* való előfordulását, aktivitását, valamint az IRS-1 előfordulását is e csillós egysejtűben. Ez az aktivitás – hasonlóan a magasabbrendűek sejtjeihez – *in vitro* gátlható volt wortmanninnal; az *in vivo* kezelések wortmanninnal és LY 294002-vel az immunprecipitátumok magasabb PI 3-kináz aktivitását eredményezték. Confocalis mikroszkópos vizsgálataok alapján a p85 immunreaktivitás a sejtek kortexére lokalizálódott: kapcsolat mutatkozott a p85- és a  $\gamma$ -tubulin tartalmú struktúrák között. A wortmannin kezelések drámai mértékben befolyásolták a sejtek actin mikrofilamentáris rendszerét, ami a sejtmag lokalizációjában igen látványos változásokat eredményezett: e kezelések során egy citoplazma áramlás indult el a cytopharynx irányában, ami számottevő mértékben gátolta a fagocitózis aktivitását is.

A *Tetrahymena* egy  $\alpha$ -, és egy  $\beta$ -tubulin génnel rendelkezik, amely utóbbi két példányban fordul elő a genomban. A sejtekben lévő 17 különböző mikrotubuláris struktúra ennek megfelelően különböző post-transzlációs modifikálódáson (acetiláció, glutamináció, glicinizálás) megy keresztül. Kísérleteinkben úgy találtuk, hogy a különböző mikrotubulus- mérgek (taxol, nocodazol, vinblastin, kolhicin) eltérő módon gátolják a *Tetrahymena* különböző mikrotubuláris struktúráinak kialakulását, így az is feltételezhető volt, hogy ezek a kezelések esetleg befolyásolhatják a tubulinok modifikációját is. Az elvégzett kísérletek tanulsága szerint a hiszton-deacetiláz gátló anyagok (trichostatin A, nordihidroguaretic acid, natriumbutirát, dicumarol), amelyek nem csak a hisztonok, hanem a tubulinok deacetilálódását is gátolják, befolyásolják *Tetrahymenában* is a tubulin acetiláció mértékét. Ez a hatás kapcsolatba hozható a sejtek szignalizációjával: e kezelések jelentős mértékben befolyásolják a szignalizációban résztvevő foszfolipidek szintézisét is. Ezek a kezelések – a tubulin-tartalmú struktúrákra való hatásuk mellett – számos egyéb változásokat is eredményeznek a *Tetrahymenában*. Így pl. a taxol kezelések – amellet, hogy látványosan gátolják a sejtek un. transzverzális mikrotubulusainak a kialakulását, igen látványos módon hatnak a mitokondriumok szerkezetére is. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, bizonyos anti-tubulin drogok használata során komplex jelenségekkel állunk szemben, ahol is nehéz eldönteni, mi volt a „primér” hatás. A *Tetrahymena* magjában számottevő mennyiségű mikrotubulus található az osztódás során, míg az interfázisos sejtmagokban hiányoznak. A magban található tubulin nem mutat soha poszt-transzlációs modifikálódást; ezek a tubulusok nem acetiláltak vagy poliglutamilálódtak, ami e struktúrák dinamizmusára utal. Több olyan anyaggal való kezelés is, amelyekről ismert, hogy gátolják a mikrotubulusok polimerizációját, a *Tetrahymenában* ellenkező hatást váltottak ki. Így pl. a myoseverin vagy a HMBA kezelések hatására megnövekedett a sejtek tubulin tartalma, s a csillók mikrotubuláris rendszere igen jelentős mértékben stabilizálódott. Ezek a jelenségek jelzik, hogy különbség mutatkozik a felsőbbrendű szervezetek és az eukariota egysejtűek mikrotubuláris struktúrái között. Ezek a vizsgálatok fontos információt szolgáltathatnak a tubulusokra ható anyagok hatásmechanizmusára is.

Más kísérleteinkben főleg a hormonális interakciókat kívántuk vizsgálni annak tisztázására, hogy ezen az alacsony filogenetikai szinten egyik hormon a másik termelődését (raktározását, szekrécióját) tudja-e befolyásolni. Ennek keretében

megállapítottuk, hogy a szteroid hormon jellegű digoxin termelődését a hisztamin, szerotonin és inzulin (mindhárom jelen van Tetrahymenában) egyaránt pozitívan befolyásolja. Legerősebb hatást a hisztamin fejtett ki, mely korábbi kísérleteinkben is a Tetrahymena számos fiziológiai paraméterét befolyásolta. Mivel korábban kimutattuk, hogy epidermal growth factor (EGF) Tetrahymenában is hatással van a sejtosztódásra, következő vizsgálatainkban kerestük, hogy az EGF és ennek receptora jelen van-e az egysejtűben. Specifikus antitesteket és konfokális mikroszkópiát, valamint áramlási citometriát felhasználva mindkettőt sikerült kimutatnunk és leírtuk lokalizációjukat is. Ezek után vizsgáltuk három hormonnak a hatását az EGF szintre. Mindegyik hormon  $10^{-6}$  és  $10^{-9}$  M koncentrációban egyaránt növelte az immunológiailag demonstrálható EGF szintet. Ezek a kísérletek arra mutattak, hogy a Tetrahymenában nemcsak a teljes endokrin rendszer képviselői (receptor, hormon, szignál transzdukció) vannak jelen, hanem hormonális interakciók is. A problémát az okozza, hogy természetes körülmények között az egysejtű vízi környezete a szecernált hormonokat extrém mértékben felhígítja, így az interakcióknak vagy sejten belül (az ugyanazon sejt által termelt hormonok között) kell végbemennie, vagy a receptornak kell rendkívül érzékenynek lennie. Ezért végeztük el következő kísérleteinket. A hormonokból (inzulin, hisztamin, szerotonin)  $10^{-6}$ -tól  $10^{-18}$  M koncentrációig készítettünk hígítási sort és a sejtekben vizsgáltuk az idegen hormon tartalom (pl. inzulin hatására a szerotonin és hisztamin tartalom, stb) változásait, 30 perces kezelés után. Megállapítottuk, hogy a hisztamin csak a magasabb koncentrációkban emelte meg a szerotonin szintet, míg a szerotonin alacsonyabb koncentrációkban (egészen  $10^{-24}$  M-ig) csökkentette a hisztamin szintet. Az inzulin egyáltalán nem befolyásolta a szerotonin tartalmat, míg a szerotonin még  $10^{-27}$  M (!) koncentrációban is növelte az inzulin tartalmat. Inzulin növelte a hisztamin tartalmat  $10^{-6}$  és  $10^{-21}$  M között, míg a hisztamin csak  $10^{-6}$  M koncentrációban befolyásolta az inzulin szintet. Ez azt jelenti, hogy a Tetrahymena környezetbe szecernált hormonjai (a magasabbrendűek hormonjainak ősei) hathatnak a közvetlen környezetben, de bizonyos esetekben olyan távol is, ahol gyakorlatilag egy molekula hormon jut egy sejtre. Figyelembe véve, hogy a Tetrahymena inzulin receptorát korábbi kísérleteinkből kiindulva már feltérképezték és azt is kimutatták, hogy az inzulin életfontos faktor az egysejtű számára, az eredmények meg tudják magyarázni miért vannak jelen a magasabb rendűek hormonjai egysejtű szinten és hogyan használja ezeket az egysejtű természetes körülmények között. E kérdések tisztázására  $10^{-6}$  –  $10^{-21}$  M koncentrációban kezeltünk hormonokkal Tetrahymenákat és figyeltük az inzulin kötődését. Endorfin, szerotonin és inzulin  $10^{-18}$  M-ig csökkentették a kötést, míg a hisztamin hatástalan volt.

Éhezés hatását is vizsgáltuk a sejtek inzulin tartalmára és a jelzett inzulin kötődésére. Mindkét index szignifikánsan emelkedett. Glukóz táplálás kioltotta a kötődési különbséget. Az éhező sejtekben az inzulin eltűnt a sejtfelszínről és bekerült a sejtek belsejébe.

Tetrahymenára alkalmaztunk egy új fixálási módszert, a karbodiimid EDAC-ot. Ez benn tartja a sejtekben a hormonokat és így azok nagyobb emnnyisége mutatható ki sejten belül. Ily módon a trijódthyronin ( $T_3$ ) Tetrahymenában való jelenlétét is sikerült kimutatnunk. Itt említjük meg, hogy több vizsgálatunkban kimutattuk a melatonin jelenlétét Tetrahymenában és a hormon hatását az egysejtűre. Ezen kívül számos molekula kemotaktikus hatásának vizsgálatában vettünk részt és mutattuk ki ennek filogenetikai jelentőségét.

